

# 激活标签法及其在植物基因工程上的应用

郑继刚,李成梅,肖英华,李雅轩

(首都师范大学生物系,北京 100037)

**摘要:**激活标签法是新近发展起来的一种用于基因分离和鉴定的方法。它通过诱变使特定内源基因发生过表达,而产生显性功能获得型突变,从而对基因进行鉴定和分析。因为具有独特的性质已使其成为发现新基因和进行基因功能分析的有效工具。本文综述了激活标签法的原理、研究现状和在植物基因工程上的应用。

**关键词:**植物;拟南芥;T-DNA;激活标签

中图分类号:Q943

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2003)04-0471-04

## Activation Tagging and the Application in Plant Genetic Engineering

ZHENG Ji-Gang, LI Cheng-Mei, XIAO Ying-Hua, LI Ya-Xuan

(Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

**Abstract:** Activation tagging is a new method for isolation and functional identification. It can generate dominant gain-of-function mutants by overexpression of a particular endogenous gene. Due to this special characteristics of activation tagging, this method has been a powerful tool for new gene discovery and gene functional analysis. This paper reviewed the principle and study conditions of activation tagging, as well as its use in plant genetic engineering.

**Key words:** plant; *Arabidopsis*; T-DNA; activation tagging

近几十年,在植物基因工程领域,特别是在植物转基因技术方面已取得了引人瞩目的成就。植物转基因技术已成为改良植物农艺性状,解决农业生产难题的重要手段。同时,它也是进行遗传学基础研究如植物基因的表达与调控,分子元件的鉴定与利用等的有效工具。鉴定和分离基因是转基因技术应用的基础。目前,分离和鉴定基因的方法有很多,如减法杂交法、功能互补法、遗传图位克隆等<sup>[1]</sup>。而利用特定DNA作为插入突变标签来鉴定和分离基因的方法在过去几十年中取得了较大进展<sup>[2]</sup>,激活标签法便是近年来该方法中发展起来的较为有效的一种方法。

激活标签法是通过诱变使特定内源基因发生过表达而产生显性功能获得型突变,从而对该基因进行鉴定和分析的方法。该方法是由Rick Walden首先提出并应用于植物(拟南芥)基因的分离和鉴定的。它有如下几个优点:(1)当激活标签法诱导产生的突变是显性时,在F<sub>1</sub>代即可观察到可见的表型改变。而采取传统的方法诱变时,其表型的变化通常要到F<sub>2</sub>代才可被观察到;(2)对于那些应用功能丢失型

突变进行分析时会产生致死效应的基因,应用激活标签法进行分析是可行的,因为经它诱导产生的突变是非致死的;(3)对于基因家族或是遗传冗余基因(genetic redundancy gene)来说,应用传统的方法是很难进行分析和鉴定的。因为很难同时使这组基因中的每个成员都发生突变而失去功能。但当这其中的某个基因在激活标签法诱变的过程中被激活而过量表达时,这个基因的功能即可被分析和鉴定。

运用激活标签法,已从拟南芥中分离出*lep*、*sturdy*等30多种新的基因,并对*ft*、*myb*、*auxin*等基因进行了详细的功能研究<sup>[3-7]</sup>,这些研究成果为激活标签法在植物基因工程方面的应用展示了广阔的前景。

### 1 激活标签法的原理

在进行植物基因工程的研究时,可以运用突变的方法将基因的功能和植物的表型特征联系起来,从而达到鉴定基因功能这个目的。我们知道,突变主要可以分为两类,即功能丢失型突变和功能获得型突变。通过传统的诱变方法,诸如

收稿日期:2002-06-27;修回日期:2002-09-25

作者简介:郑继刚(1978-)男,北京人,硕士研究生,专业方向:植物分子遗传学。Tel:010-68900343

通讯作者:李雅轩(1965-)女,北京人,硕士学位,副教授,研究生导师,专业方向:分子遗传学。E-mail:lyx1006@sohu.com

乙基甲磺酸(EMS)化学诱变法、转座子标签法和 T-DNA 标签法等,得到的突变都属于功能丢失型突变,即外来物的诱变使基因的内部结构发生改变,从而丧失了原有的功能。应用这些传统的方法,我们可以分离和鉴定几乎所有能够得到的功能丢失型突变基因。虽然诱发功能丢失型突变是基因研究的一个重要方法,但在研究基因家族或是遗传冗余基因,以及在研究那些生命体生命周期内所必需的、缺失会引起致死效应的基因时,功能丢失型突变就显得无能为力了,而功能获得型突变则能很好地解决这些问题。

功能获得型突变可以通过以下两种方式获得:(1)对基因的编码区进行诱变,使其产物具有新的功能,例如乙烯应答途径中 *etr1*<sup>[8]</sup> 的显性突变;(2)诱发使基因的表达水平和表达方式发生改变的突变,如 *antp*<sup>[9]</sup> 基因的显性突变。对诱变基因的表达水平和表达方式发生改变的突变方式,以前是采用染色体重排来诱导,或是采用携带有由新的启动子或增强子控制的基因的转座子来诱导的<sup>[10-12]</sup>。1992年,Walden 和他的研究小组首次提出了激活标签诱变法,它是一种更直接和有效地让基因表达水平和表达方式发生改变的突变方法。他们构建了一个 T-DNA 载体,在这个载体的右侧边缘区附近,含有一个由来自花椰菜花叶病毒 35S 启动子的增强子单元构成的四聚体。通过农杆菌感染的方法,将这个 T-DNA 载体随机插入到植物的基因组中,因其中增强子的作用,位于插入位点附近的植物基因会发生过量表达,并且在植物表型中显现出来。从而将该过量表达的基因与植物的表型联系起来,达到对该基因进行鉴定并实施分离的目的。通过对大量用该方法诱导的拟南芥转化体的研究,发现绝大部分发生过量表达的基因都与增强子四聚体相接近,距离范围在 0.38kb 到 3.6kb 之间<sup>[13]</sup>。

## 2 激活标签法中的载体

### 2.1 T-DNA 的结构和功能

T-DNA 是根瘤农杆菌 Ti 质粒上的一个片段,约占 Ti 质粒 DNA 总长度的 10% 左右。通过农杆菌对植物的感染,T-DNA 可随机整合到植物核基因组 DNA 的许多不同的位点上。关于 T-DNA 转移和整合的机制迄今尚不十分清楚。已知在 T-DNA 的两侧是一对保守的,25bp 长的同向重复序列,称为 T-DNA 的边缘区。T-DNA 的左侧边缘区称作 LB 序列,右侧称作 RB 序列。一般认为,这种序列在 T-DNA 转移到植物细胞并整合到核基因组的过程中是必需的。RB 序列在转移过程中起着引导作用,即引导 T-DNA 定向地从根瘤农杆菌细胞转移到寄主植物细胞。而 LB 序列通常是通过产生单链缺失的办法来限定被转移的 T-DNA 片段的大小范围<sup>[14]</sup>。根据 T-DNA 能够随机插入植物核基因组的特性,它已作为植物基因的插入突变原广泛应用于基因的鉴定和分离中。而且,T-DNA 在基因捕捉<sup>[15]</sup>,以及本文叙述的激活标签法等方法中,均作为主要的载体发挥重要作用。

### 2.2 激活标签的质粒载体

要对目标植物进行遗传转化,需要将构建好的含增强子四聚体和抗性标记的 T-DNA 整合到适当的质粒基因组中。目前,用于构建激活标签载体的质粒主要是 pBluescriptKS (+)。构建出的常用的激活标签质粒载体主要有 pPCVICEn4HPT、pSKI015、pSKI074 等。载体 pPCVICEn4HPT 由 Hayashi 等于 1992 年构建<sup>[16]</sup>,以潮霉素抗性基因作为选择标记。但在实践中,潮霉素对拟南芥幼苗的选择效果不太理想,并且潮霉素对人体有毒害作用。于是,Weigel 等发展了两种新的载体,即 pSKI015 和 pSKI074<sup>[13]</sup>。

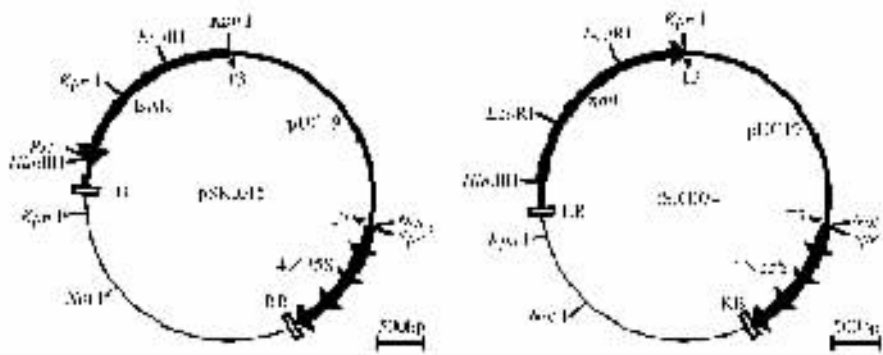


图 1 Weigel 等构建的激活标签载体 pSKI015 和 pSKI074 的结构

Fig. 1 The structure of activation tagging vector pSKI015 and pSKI074

pSKI015 含有一个抗除草剂的抗性基因,因此可以方便地对种植在土壤中的植物进行转化体筛选。pSKI074 含有的是抗卡那霉素的抗性基因。由它转化的植物可以在人工培养基

中方便地进行幼苗筛选。利用这两种质粒载体,已经在拟南芥中分离出 *bas1*<sup>[17]</sup>、*brsl*<sup>[18]</sup> 等基因,并对 *cyp78a9*<sup>[19]</sup>、*fri* 和 *flc*<sup>[20]</sup> 等基因进行了基因功能的研究。

### 3 激活标签突变体的检出和鉴定

在进行植物转化时,通常采用真空渗透法(vacuum infiltration method)<sup>[21]</sup>,但也有采用喷洒法的。实验数据表明,这两种方法在激活标签诱变中的转化率大致相同,即在所收获的种子中转化率约为 2%<sup>[13]</sup>。

转化后得到的第一代转化体,T-DNA 插入物处于杂合状态。在应用抗生素或是除草剂检出突变体后,还要通过表型的变化对其进行筛选,因为激活标签诱变产生的显性突变在杂合状态下是明显可见的。在第一代转化体中,诸如不育,顶端优势下降或者白化等典型的表型改变大量存在,大约在 100 个样本中就会出现 1 个<sup>[13]</sup>。具有异常形态表型的第一代突变体,如果自交可育,使其自花授粉;如果自交不育,使其与非转化体的亲本株系回交,然后对子代进行表型遗传率的检测。在 Weigel 关于拟南芥的实验中,约有一半的子代显现出突变表型,而另一半则显现出野生表型。

为确定所得到的突变表型是否是由于相关基因的过量表达所引起的,我们须在选择标记和突变表型共分离的株系中,对 T-DNA 插入物进行研究。首先,应用可对激活标签进行质粒拯救的限制性内切核酸酶,如 *EcoRI*、*HindIII* 等,对从突变体中提取出来的基因组 DNA 进行消化。再将与 T-DNA 插入物相邻的植物 DNA 序列进行质粒拯救,做限制性酶切图谱分析,测序,并与 GenBank 中的序列比较。通过质粒拯救分离出来的植物 DNA 序列的长度从数百个 bp 到 10kb 不等<sup>[13]</sup>。通过对这些与 T-DNA 插入物相邻的植物 DNA 序列进行分析,再通过 Northern 杂交,我们就可以确定与 T-DNA 插入物相邻的植物 DNA 序列是否是一个过量表达的基因。T-DNA 插入物到过量表达基因之间的距离在 0.38kb 到 3.6kb 之间。并且 CaMV 35S 增强子四聚体在基因的上游或是下游都可以诱发该基因的过量表达。这说明激活标签载体中的增强子序列的作用与正常的增强子序列相同<sup>[22]</sup>。与许多功能丢失型突变体不同的是,激活标签诱变的突变体中的 T-DNA 插入物不会发生重排<sup>[23]</sup>,因而可以很方便地对与 T-DNA 插入物相连的植物 DNA 进行质粒拯救和确定 T-DNA 插入物的结构。

为验证突变表型确实由基因过量表达产生,还需要考虑突变表型的重现性问题。可以用以下两种方式进行突变表型重现性研究:(1)将突变体的基因片段转入野生型株系,从而再现显性突变表型。这需要将包含有 CaMV 35S 增强子四聚体和与之相比邻的植物 DNA 序列的突变体 DNA 克隆到一个普通的 T-DNA 载体上。这种方法直接而有效。但当质粒拯救的序列没有完全包括 CaMV 35S 增强子四聚体和过量表达基因时,就不能使突变表型重现。(2)将处于完整的 CaMV 35S 启动子控制下的突变体的 cDNA 或是基因组片段转入野生型株系中。

### 4 激活标签法研究的现状

目前,对于功能缺失型突变的基因有较完善的分离和鉴定的方法。但许多重要的植物基因或是生命周期所必需,或是基因家族或遗传冗余基因中的成员,无法产生功能缺失突变。因此用一般的方法很难克隆和进行功能研究。研究这些基因的方法之一就是激活标签法。事实上,应用这种方法已经分离并鉴定了多种用传统方法难以研究的基因,如拟南芥中控制叶柄发育的基因(*lep*),与茎强度有关的基因(*sturdy*)以及影响花发生时间的基因(*ft*)等。在国内,遗传与发育所李家洋院士领导的研究小组也已在组内建立起自己的 T-DNA 激活标签体系,并准备将其运用到植物激素的作用与分子机理的研究当中。

激活标签法目前还主要应用于对拟南芥的研究,这主要是因为 T-DNA 对于那些基因组很大的植物很难得到足够多的插入突变体。并且,在 T-DNA 插入突变中,很大一部分突变体的 T-DNA 和突变表型不能共分离<sup>[24]</sup>。已有人将转座子应用到激活标签法中充当载体,并取得一定的成功<sup>[25]</sup>。这将克服 T-DNA 的一些不利因素,扩大激活标签法的应用范围,使激活标签法在植物基因的分离、鉴定和植物基因功能的研究中发挥更大的作用。

### 参 考 文 献 (References):

- [1] QU Shao-Hong, ZHANG Wen-Jun, JING Jian-Kang, LI Yin-Xin, ZHU Zhi-Qing, HU Han. Transposition behavior of the maize transposable element *Ac* in transgenic haploid tobacco [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1998, 25(2): 150~154.  
瞿绍洪, 张文俊, 景健康, 李银心, 朱至清, 胡 含. 玉米转座子 *Ac* 在单倍体烟草中转座的研究 [J]. *遗传学报*, 1998, 25(2): 150~154.
- [2] LIAO Ming-Juan, DONG Ai-Hua, WANG Zheng-Dong, ZHU Mu-Yuan. Plant transposon and the application in functional genomics [J]. *Hereditas* (Beijing), 2000, 22(5): 345~348.  
廖鸣娟, 董爱华, 王正栋, 朱睦元. 植物转座子及其在功能基因组学中的应用 [J]. *遗传*, 2000, 22(5): 345~348.
- [3] Eric van der Graaff, Amke Den Dulk Ras, Paul J J Hooykaas, et al. Activation tagging of the leafy petiole gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 2000, 127: 4971~4980.
- [4] Huang S, Cerny R E, Bhat D S, et al. Cloning of an *Arabidopsis patatin* like gene, sturdy, by activation T-DNA tagging [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 573~584.
- [5] Kardailsky I, Shukla V, Ahn J H, et al. Activation tagging of the floral inducer *FT* [J]. *Science*, 1999, 286: 1962~1965.
- [6] Borevitz J O, Xia Y, Blount J, et al. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 2383~2394.
- [7] Zhao Y, Christensen S K, Fankhauser C, et al. A role for flavin

- containing monooxygenases in auxin biosynthesis[J]. Science, 2001, 291:306~309.
- [8] Chang C, Kwok S F, Bleecker A B, *et al.* *Arabidopsis* ethylene response gene *etr1*; similarity of product to two-component regulators[J]. Science, 1993, 262:539~544.
- [9] Schneuwly S, Klemenz R, Gehring W J. Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*[J]. Nature, 1987, 325:816~818.
- [10] Smith L G, Greene B, Veit B, *et al.* A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates[J]. Development, 1992, 116:21~30.
- [11] Miller M W, Duhl D M, Vrieling H, *et al.* Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the *lethal yellow* mutation[J]. Genes Dev, 1993, 7:454~467.
- [12] Brunner E, Brunner D, Fu W, *et al.* The dominant mutation *Glazed* is a gain of function allele of *wingless* that, similar to loss of APC, interferes with normal eye development[J]. Dev Biol, 1999, 206:178~188.
- [13] Weigel D, Ahn J H, Blázquez M A, *et al.* Activation tagging in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2000, 122:1003~1014.
- [14] 吴乃虎编著. 基因工程原理(下册)(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 241~251.
- [15] Tang Wei, Vanessa Samuels, Janet Ogbon. Functional genomics; Gene identification via T-DNA mediated gene trap tagging in plants[J]. Journal of Forestry Research, 2001, 12:1~8.
- [16] Hayashi H, Czaja I, Lubenow H, *et al.* Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin independent growth *in vitro* [J]. Science, 1992, 258:1350~1353.
- [17] Neff M M, Nguyen S M, Malancharuvi E J, *et al.* BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96:15316~15323.
- [18] Li J, Lease K A, Tax F E, *et al.* BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRII signaling in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98:5916~5921.
- [19] Ito T, Meyerowitz E M. Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, CYP78A9, induces large and seedless fruit in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2000, 12:1541~1550.
- [20] Lee H, Suh S S, Park E, *et al.* The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*[J]. Genes Dev, 2000, 14:2366~2376.
- [21] Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. In planta agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants[J]. CR Acad Sci, 1993, 316:1194~1199.
- [22] Fang R X, Nagy F, Sivasubramaniam S, *et al.* Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in trans-genic plants[J]. Plant Cell, 1989, 1:141~150.
- [23] Feldmann K A. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum [J]. Plant J, 1991, 1:71~82.
- [24] Errampali D, Patton D, *et al.* Embryonic lethals and T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*[J]. Plant cell, 1991, 11:149~157.
- [25] Kumar C S, Narayanan K K. Plant transposable elements and functional genomics[J]. Plant Biotechnology, 1998, 15(4):159~165.

## 欢迎订阅 2004 年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物育种栽培研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的全国性学术刊物。主要刊登国、内外农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、生态、种质资源、谷物化学、贮藏加工以及与农作物有关的生物技术、生物数学、生物物理、农业气象等领域以第一手资料撰写的学术论文、研究报告、简报以及专题综述、评述等。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生(包括研究生)和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》2004年由双月刊改为月刊,96页/期,定价:20元/册,全年240元。可通过全国各地邮局订阅,邮发代号:82-336。也可向编辑部直接订购。

编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街12号中国农科院作物所《作物学报》编辑部 邮编:100081

刊号:CN11-1809/S 联系电话:010-68918548 传真:010-68975212

银行汇款:北京农行海淀北下关分理处 帐户:中国作物学会 帐号:801181-98。

E-mail:xbzw@chinajournal.net.cn zwx301@mail.caas.net.cn